细菌小 RNA 的调控及在代谢工程中的应用

赵秀丽 周丹丹 闫晓光 吴昊 财音青格乐 李艳妮** 乔建军

(天津大学化工学院 系统生物工程教育部重点实验室 天津化学化工协同创新中心合成生物学平台 天津 300072)

摘要 细菌代谢工程需要优化基因的表达来平衡代谢物通量分布和减少有毒的中间体积累，从而提高产物生物合成。细菌小 RNA（small RNA，sRNAs）与靶标 mRNA 通过碱基互补配对结合来抑制或激活其靶标基因的表达。sRNA 在细菌的生理过程中都起到了至关重要的调控作用，因此被认为是细菌代谢工程中调节靶标基因表达的有力工具。近年来，越来越多的人工合成 sRNA 在细菌代谢工程中得到应用，本文分别就细菌 sRNA 的靶标识别和其对靶标的调控及代谢工程中的应用做了总结概括。

关键词 细菌；小 RNA；调控；代谢工程

中图分类号 Q752

Regulation and Application in Metabolic Engineering of Bacterial Small RNAs

ZHAO Xiu-li ZHOU Dan-dan YAN Xiao-guang WU Hao CAIYIN Qing-gele LI Yan-ni QIAO Jian-jun

(Department of Pharmaceutical Engineering，School of Chemical Engineering and Technology，Tianjin University; Key Laboratory of Systems Bioengineering，Ministry of Education; Syn Bio Research Platform，Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering，Tianjin 300072，China)

Abstract Metabolic engineering in bacteria requires optimization of gene expression levels to balance metabolic flux distributions and minimize accumulation of toxic intermediates towards an efficient biosynthesis of target products. Small non-coding RNAs (sRNAs) in bacteria can interact with their target mRNA by base-pairing to inhibit or activate the translation of their target genes. Since small RNAs play critical regulatory roles in many physiological processes, they are considered to be powerful tools for the tuning of target genes expression in bacterial metabolic engineering. Many artificial sRNAs are applied in metabolic engineering in recent years. In this review, identification of sRNA targes genes, interaction between sRNAs and their targets and application of sRNAs in metabolic engineering were summarized.

Key words Bacteria; Small RNAs; Regulation; Metabolic engineering[1]

细菌代谢工程为环境治理、医学应用，可再生能源的化工生产提供了支持，

收稿日期：2017-03-06，修回日期：2017-03-27

*国家自然科学基金（31570049）资助项目

**通讯联系人，电子邮箱：liyanni@tju.edu.cn

但是代谢工程也面临诸多问题，如平衡关键代谢物的流量分布、有毒中间体积累和生产环境压力等。为了更好的感知和响应对外界环境的变化，同时完成自身的体内循环，使代谢产物的生物合成更高效，越来越多的细菌 sRNA 应用于代谢工程中。细菌 sRNA 是一类长度在 50-500 nt 之间，不编码蛋白质的 RNA 分子，主要以转录后调控的形式来发挥其调控作用。这样可以利于较小的靶标 mRNA 的周转并且可以完成对不同靶标的分级调控[1]。sRNA 是从转录水平对菌体生理活动进行调控，设计和合成 sRNA 策略的优势在于不需要敲除染色体基因组，就可以调控微生物代谢网络，避免了突变菌株库的构建过程，省时省力；而且 sRNA 的表达不会为微生物代谢增加负担。现已发现了超过 150 多种细菌 sRNA[2,3]，有关 sRNA 的研究大多集中于革兰氏阴性菌。近年来伴随着现代生物学和信息学手段、技术的飞速发展，也有越来越多的 sRNA 在革兰氏阳性菌中（如酿脓链球菌 *Streptococcus pyogenes*[4]，乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis*[5]）被发现，其生物学功能也逐渐被揭示。

1 细菌 sRNA 靶标基因的预测与鉴定

随着大量的 sRNA 被发掘，识别 sRNA 的靶标进而探究其功能已然成为当今生物学领域研究的热点之一。细菌 sRNA 靶标基因的识别主要通过基于生物信息学的计算机预测方法与实验分析方法结合来进行。

生物信息学的计算机预测方法对细菌 sRNA 靶标的预测主要依据序列长度、碱基匹配、RNA 二级结构、序列保守性及其位置等特点。目前常用的 sRNA 靶标 mRNA 预测的软件有 RNAPredator[6]、sRNATarBase[7]、CopraRNA[8,9]、RNAup[10]、sRNATarget[11]、sTarPicker[12]、IntaRNA[13]、TargetRNA2[14]、RNAcofold[15]、RNAplex[16]和 RNAhybrid[17]。CopraRNA、RNAplex、IntaRNA、RNAup 和 TargetRNA2 是识别最有可能发生相互作用的局部区域并打分；RNAhybrid 和 RNAcofold 更多用于 sRNA 与较长的 RNA 相互作用时。局部相互作用的软件(CopraRNA、IntaRNA、RNAplex、RNAup、TargetRNA2)比全部相互作用的软件（RNAhybrid 和 RNAcofold）要好[18]。经实验验证软件的配对率 IntaRNA/CopraRNA*76.7%， RNAplex73.6%， TargetRNA2 55.9%， RNAup 78.9%[18]。主要用于预测 sRNAs 靶标 mRNAs 计算机工具的特点比较见表 1。

表 1 预测 sRNAs 靶标 mRNAs 的主要计算机工具

Table 1 Main computational tool for prediction of bacterial sRNAs target mRNAs

软件名称	网址	主要特征	参考文献
RNApredator	http://rna.tbi.univie.ac.at/RNApredator	可预测与靶标位点相互做的的可及性位点	[6]
sRNATarBase3.0	http://ccb1.bmi.ac.cn/srnatarbas	预测 sRNA 与 mRNA 及 sRNA	[7]

	e/	与蛋白之间的相互作用，给出 sRNA 与 mRNA 结合区域详细信息	
CopraRNA	http://rna.informatik.uni-freiburg.de.	比较预测，合并并拓展了 IntaRNA，预测结果伴随着大量后处理方法（功能富集分析、可视化交互的地区）	[8,9]
RNAup	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAup.cgi	考虑到结合位点的可及性	[10]
sRNATarget	http://ccb.bmi.ac.cn/srnatarget/	考虑到 RNA 序列和 RNA 二级结构; naı¨ve Bayes 方法	[11]
sTarpicker	http://ccb.bmi.ac.cn/starpicker/	热力学稳定性; sRNA 和靶标相互作用的可及性位点; naı¨ve Bayes 方法	[12]
IntaRNA	http://www.bioinf.uni-freiburg.de/Software/	考虑到用户特殊种子区域的存在及影响 sRNA 与靶标相互作用的可及性位点	[13]
TargetRNA2	http://snowwhite.wellesley.edu/targetRNA/	杂化能，不考虑 sRNA 或 mRNA 结构	[14]
RNAcofold	http://www.tbi.univie.ac.at/RNA/	针对两个序列的最低能	[15]
RNAplex	http://www.tbi.univie.ac.at/~htafer/	针对两个序列的最低能量算法。运行速度快	[16]
RNAhybrid	http://bibiserv.techfak.unibielefeld.de/ranhybrid/	针对两个序列的最低能量算法。忽略了分子内碱基互补和多重茎环结构	[17]

用于验证 sRNA 靶标基因的方法有很多种，目前比较成熟，使用较多的有：遗传学方法、亲和技术、免疫共沉淀法和微阵列技术。除此之外，ribosome profiling (Ribo-seq)技术是最近开发的基因组规模的方法，可以同时确定体内 RNA 水平和翻译水平[18]，Jing Wang 等[19]使用 Ribo-seq 全面验证大肠杆菌（*Escherichia coli*）sRNA RyhB 已知的靶标，并确定很多新奇的 sRNA 靶标。实验数据表明，Ribo-seq 是一种识别 sRNA 靶标强大的方法，并且是检测 sRNA 各级调控(即转录、mRNA 稳定性、翻译)的有效方法。各种用于鉴别 sRNA 靶标的方法的比较见表 2。

表 2 鉴别 sRNA 靶标的方法的比较

Table 2 Comparison of methods of sRNA target identification

方法	主要靶标类型	优点	缺点	实例 (sRNA/mRNA)
遗传学方法	mRNA	一般通过与表型相关的生理特征进行靶标识别；也能反向进行	调节因子具多重效应使得复杂化	MicF/*ompF* [20]

亲和技术	蛋白和 mRNA	直接鉴定相互作用;能找到第一靶标	亲和力较低、靶标量较少难操作	RseX/*ompa* 和 *ompC* [21]
免疫共沉淀	蛋白和 mRNA	直接识别靶标	出现假阳性或靶标量较少易出错	RydC/*yejAB*[22] MucR/*mucR*[23]
微阵列	mRNA	高产、高灵敏度	假阳性较多、mRNA 水平受到影响时才有效	GcvB/*cycA*[24]
蛋白组学	蛋白和 mRNA	不考虑相互作用方式	识别范围小，表达量少或不溶性蛋白不易被检测到	MicA/*ompA*[25]
Ribo-seq	蛋白和 mRNA	灵敏，具体，可检测 sRNA 各个水平的调控靶标	表现大量假阴性	RyhB /*shiA*，*cirA* 和 *acnB*[19]

2 细菌sRNA与其靶标的相互作用

细菌非编码 sRNA 按照其在基因组中的位置不同，可以分为顺式编码 sRNA(*cis*-encoded sRNA)和反式编码 sRNA*(trans*-encoded sRNA)，顺式编码 sRNA 由它所调控的 mRNA 的互补链合成，可以通过与靶标 mRNA 进行严格的互补配对，抑制其表达或使其基因沉默[26]。细菌 sRNA 以反式编码 sRNA 为主，反式编码 sRNA 大部分都需要 RNA 分子伴侣 Hfq 蛋白的协助来发挥作用，主要通过与靶标 mRNA 上 7-12 个碱基进行不严格的互补配对，抑制或促进靶 mRNA 的翻译，加速或减缓靶 mRNA 的降解。

2.1 细菌sRNA与mRNA的相互作用

2.1.1 sRNA调节mRNA翻译和mRNA稳定性

通常情况下，反式编码 sRNA 通过与位于靶标 mRNA5′-UTR 的核糖体结合位点（RBS）进行不完全互补配对阻止 30S 核糖体的结合和翻译的起始（图 1a)，例如在大肠杆菌中被首次发现的主要孔蛋白 OmpC 合成抑制因子 sRNA MicC，MicC 通过与核糖体竞争结合位点抑制 ompC 翻译[27]。还有一种抑制方式是 sRNA 在 Hfq 的协助下与正在进行翻译的 mRNA 结合，导致 mRNA 的发生结构重组，RBS 区域进行碱基互补结合形成二级结构阻止了核糖体结合，使得翻译抑制（图 1c）。相反，有些 sRNA 通过与靶标的 5′-UTR 区结合激活翻译，通常这些靶标 mRNA 5′-UTR 区内在的二级结构阻止核糖体结合，当 sRNA 结合到 5′-UTR 区，RBS 被打开，使翻译起始(图 1d)。例如在大肠杆菌中 DsrA 和 RyhB 可分别促进 *Rpos*[28]和 *shiA*[29]的翻译起始，就是这种调节机制在发挥作用。

RNA 稳定性的调节是 sRNA 主要的调节机制，GadY 属于顺式编码的一类

sRNA，这种结合通常引导一个负调控，可以积极调节 gadW 和 gadX mRNA 水平参与应对酸压力。GadY 可以直接与 gadX-gadW mRNA 基因间区域进行严格的碱基配对，形成双链结构，增加 mRNA 的稳定性，保护 m RNA 不被 RNaseE 降解[30-32]（图 2b）。

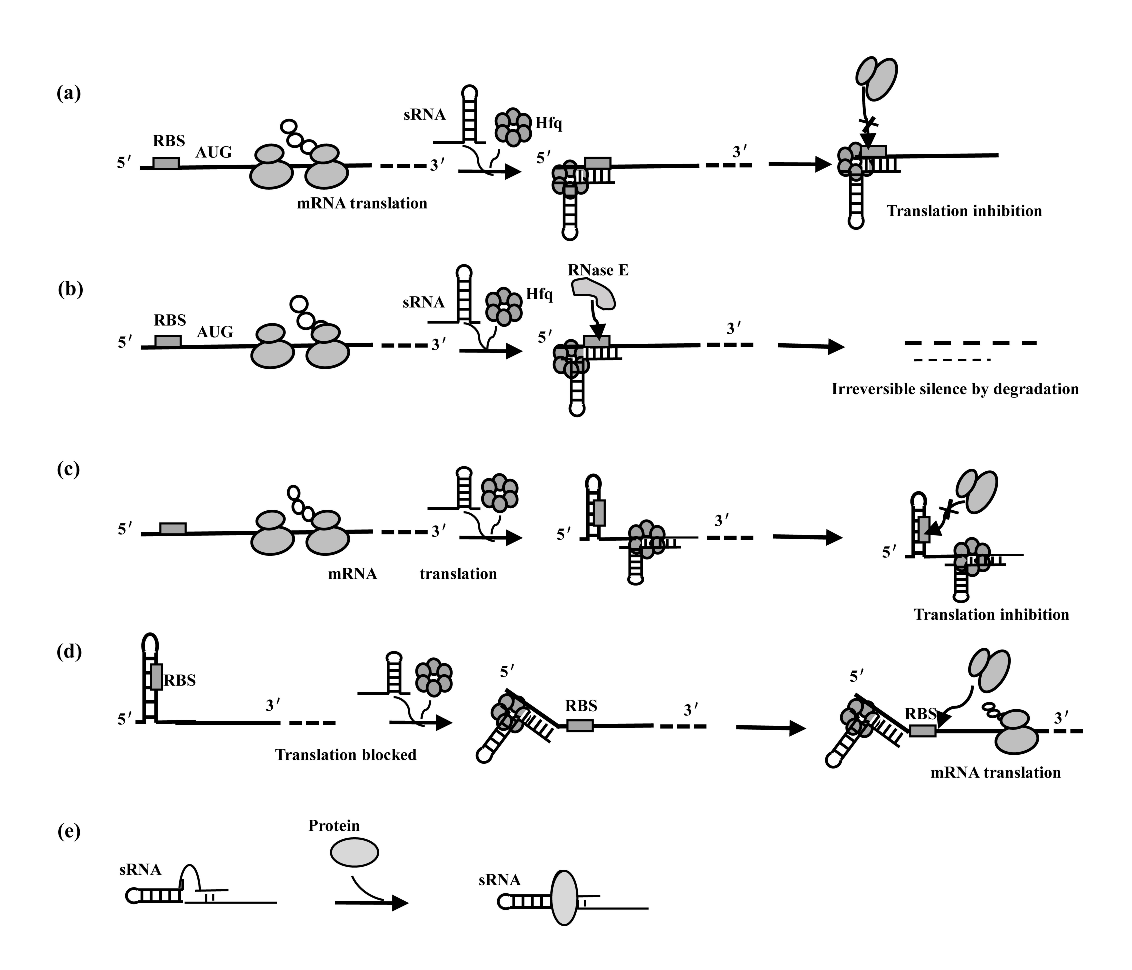


图 1.反式编码 sRNA 调控靶标的机制

Fig. 1 Regulatory mechanisms of *trans*-encoded sRNAs.

(a) Translation inhibition by blocking of RBS. (b) s RNAs imperfectly base-pair with target m RNAs in order to repress translation and speed up degradation by RNase. (c) Translation inhibition by blocking of RBS (d) Translation activation by mediating mRNA structure change (e) s RNAs act by binding to the target protein to regulate their activities

2.1.2 sRNA调节mRNA降解

sRNA 调控靶标 mRNA 的另一种机制是与 mRNA 碱基互补配对后，在核酸酶 E(RNase E)作用下使 mRNA 降解。参与靶 mRNA 降解的 RNase E 可以特异性地作用于富含 AU 的单链 RNA，将靶 mRNA 和 sRNA 同时降解[33,34](图 1b 和图 2a)。在这一机制中 Hfq 参与 sRNA 诱导的 mRNA 降解。最先发现的 sRNA 调控 mRNA 降解的是 RyhB，在铁离子缺乏的情况下，RyhB 可导致至少 18 种编码需铁蛋白的 mRNA 在 10 分钟内迅速降解，使铁离子重新分布到细胞重要区域[35]。

类似的快速降解 mRNA 机制也在其他 sRNA 如 OmrA，OmrB[36]和 RybB[37]中得到证实。在 RNaseE 的作用下通过 sRNAs/Hfq 导致 mRNA 的降解的作用机制还不是很清楚，但可以从两种途径来说明 mRNA 的不稳定性：一种可能是 mRNA 与 sRNA 碱基互补配对之后，失去核糖体的保护其更容易受 RNase 的攻击；另一种可能是所形成的 sRNA/Hfq/RNase E 复合物对 RNA 的降解有促进作用。

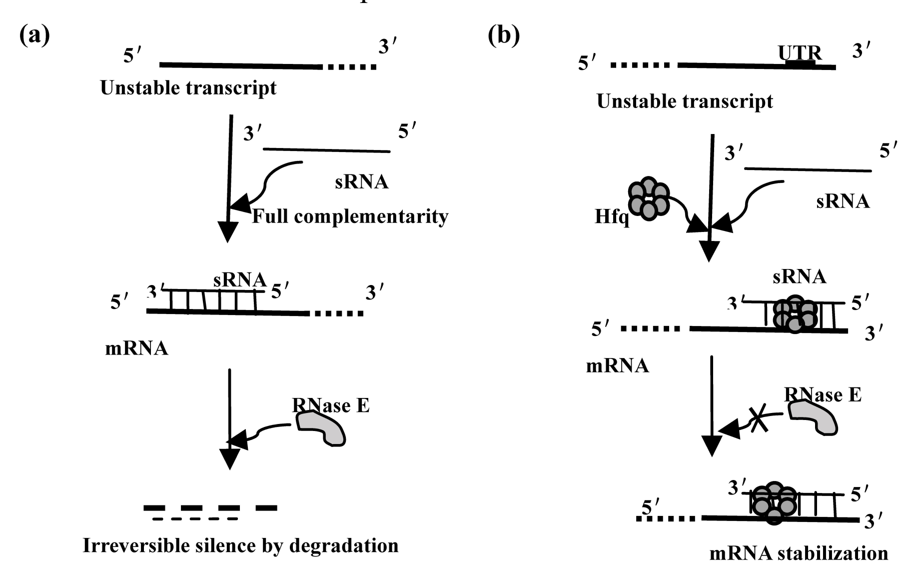


图 2.顺式编码 sRNA 调控靶标的机制

Fig.2 Regulatory mechanisms of *cis*-encoded sRNAs.

(a). sRNAs perfect complementarity with targets and degraded by an RNase E .(b). sRNAs complementarity with mRNA forming duplex structure to increase the stability of mRNA.

2.2 细菌sRNA与蛋白相互作用

sRNA 可与相应蛋白质结合行使相应的调控功能，sRNA 和 sRNA 结合蛋白的研究均具有重要意义。大多数 sRNA 需要与蛋白质结合在体内起作用，sRNA 和蛋白质相互作用可以分为两大类：调控 RNA 结合蛋白、调节酶的活性。

sRNA 调节 RNA 结合蛋白通常是通过模仿作用，如在大肠杆菌中，sRNA 基因 CsrB 和 CsrC 是 CsrA 蛋白(全局转录后调控因子)的拮抗物，CsrB 和 CsrC 与 CsrA 蛋白相互作用可形成一个调控反应回路，从而调控该蛋白的活性[38]。CsrA 通过与 glgC(糖原代谢基因)转录物的 RBS 周围序列结合抑制翻译的起始。CsrB 和 CsrC 可通过与 CsrA 蛋白结合，作为 CsrA 的拮抗物发挥调节功能[39,40]。

有些 sRNA 结合具有酶活性的蛋白质，有可能抑制、激活或修改蛋白质的活动。在大肠杆菌中，6sRNA 可以通过与σ70-RNA 聚合酶的相互作用改变σ70-RNA 聚合酶对启动子识别的特异性。在转录起始时 6sRNA 二级结构的很大程度上模仿了 DNA 构象，与 s70-RNA 聚合酶全酶结合改变 RNA 聚合酶的活性，从而抑制启动子区域-10bp 上游含 TGn 序列（TGn TATAAT）基因的转录[41,42]。Smaldone

等[43]在枯草芽孢杆菌中发现了 FsrA，FsrA 能与三种蛋白 FbpA、FbpB 和 FbpC 共同作用，抑制包括 TCA 循环中的琥珀酸脱氢酶和乌头酸酶以及含铁硫簇的谷氨酸合酶等的合成，从而调节细菌体内的铁离子平衡和代谢稳定。目前已经报道的 sRNA 结合蛋白见表 3 所示。

表 3 sRNA 结合蛋白的总结

Table 3 Summary of sRNA-binding protein

sRNA 结合蛋白	所在菌株	结合的 sRNA	参考文献
Hfq	*E.coli* *Salmonella enteritidis*	ArcZ、Oxys、DsrA、RprA	[38-40]
σ70-RNA 聚合酶	*E.coli*	6S RNA	[41,42]
FbpA、FbpB、FbpC	*B.subtilis*	FsrA	[43]
RsmA	*Pseudomonas aeruginosa*	RsmY、RsmZ	[44]
CsrA、RsmA、RsmE	*E.coli*	CsrB、CsrC	[45,46]
RsmA	*Pseudomonas fluorescens*	RsmY	[44]
RsmA	*P. fluorescens*	RsmX	[47]
RsmE	*P.fluorescens*	RsmY	[47]

3 细菌sRNA的功能与代谢工程中的应用

sRNA作为一种重要的基因表达调控工具，随着微生物中sRNA越来越多的被发现，它在微生物体内所起的作用以及调控机制也逐渐被阐明，其为改变细菌生理特性、改变菌株代谢途径、提高菌株的代谢物产量和微生物细胞工厂构建的方法创新提供了可能。

3.1 细菌sRNA的功能

随着越来越多的细菌 sRNA 被识别，其在菌株中所起的作用也逐渐被挖掘出来。细菌 sRNA 可通过调控细菌在宿主细胞中的毒力启动细菌细胞内部的相关机制，使细菌对生长条件的变化做出反应来适应感染细胞内的环境变化[48]，也可以通过调节群体感应系统的感应调节蛋白的表达来控制菌体的密度[49]。在生长环境中营养物质不足时，细菌 sRNA 可在抗营养应激（碳源、氮源）也发挥的重要的调控作用，在大肠杆菌中，sRNA 基因 CsrB 和 CsrC 既调节糖原代谢[50]也可以调控氨基酸的代谢过程[51]。

细菌细胞中的微量元素是细菌代谢过程中不可缺少的一部分，有些参与辅助酶促反应，sRNA 可以调节微量元素在细胞中的含量使其相对平衡，如 sRNA 基因 RyhB 在大肠杆菌中能调节 Fur 基因的表达，在减缓细菌的铁饥饿中起着重要作用[52]。而 sRNA 基因 RyhB 在福氏志贺氏菌可以调节 ydeP 基因的表达水平从而调控耐酸性[53]这点也说明了同种 sRNA 在不同细菌中可能有不同的调控机制，导致不同的功能效应。除了可以调控酸耐受之外，sRNA 也可以调节其他环境应激，如温度[54]、氧气胁迫[55]。一种反式编码 sRNA 基因 DsrA 在大肠杆菌中可以

调节菌体对温度变化的感应。当温度较低时，DsrA 可以在 Hfq 蛋白协助下与 RpoS mRNA 的前导序列碱基配对，激活 mRNA 的翻译，DsrA 大量表达，促进 RpoS 基因调控细菌 RNA 聚合酶的σ因子的表达[56-58]。sRNA 的不同调控功能见图 3。

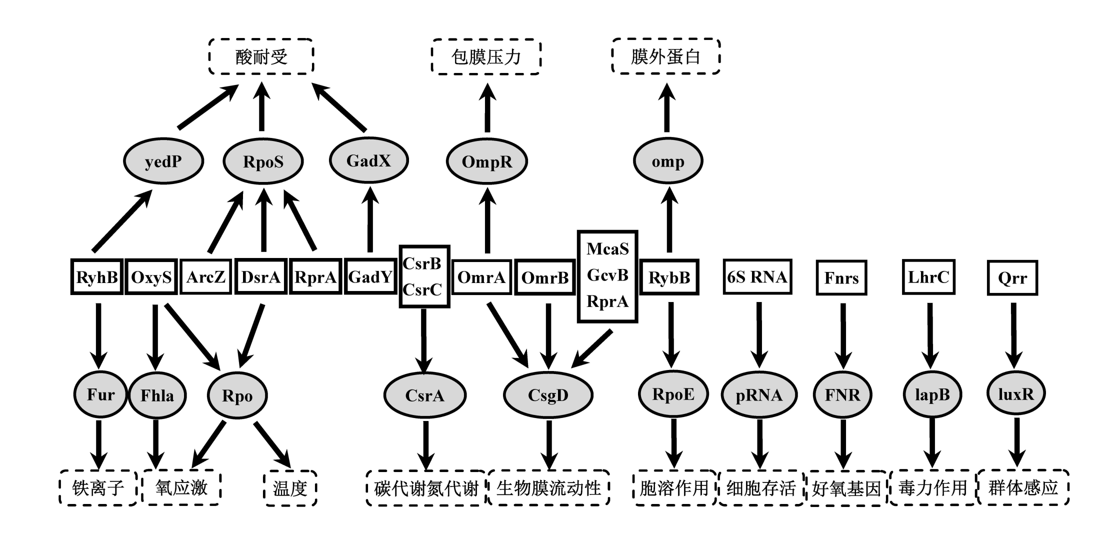


图3 细菌sRNA对多种胁迫的调控作用

Fig. 3 Bacterial sRNA modulate cells to resist various stresses

3.2 过表达细菌sRNA来调控环境胁迫

由于 sRNA 在许多环境压力中扮演至关重要的角色，如在发酵过程中，对保持鲁棒性和长期在压力条件下生产力起重要作用。因此，提高菌株的耐受性将有利于生物工艺应用。sRNA 基因 DsrA 被认为是大肠杆菌中的一个多功能的基因调节器，全局转录调控因子 rpoS，是由 sRNA DsrA，RprA，和 ArcZ 转录后的调节，由 OxyS 下调表达[59]。最近，Gaida 等[60]报道，同时过表达 DsrA RprA，ArcZ 可大幅增加酸耐受并在对数生长期对羧酸和氧化应激提供保护。同样，应用这种多种转录后调控策略，Kang 等[61]建造了一个压力诱导系统来生产高级生产化学品、包括聚羟基丁酸酯和 1，3-丙二醇。因此，用 sRNA 来提高压力耐受是一种有效的策略。

本实验室以乳酸乳球菌 F44 为研究对象，在酸胁迫下转录组测序和差异基因表达分析挖掘乳酸乳球菌的 sRNA，运用 sRNA 过表达的方法实验验证并筛选能明显提高乳酸乳球菌 F44 的 sRNA。由预测验证得到的 sRNA 真正靶标来分析 sRNA 作用的耐酸机制。通过人工设计合成 sRNA，然后将其导入乳酸乳球菌 F44 中构建出新的高耐酸菌株，从而提高菌株耐受酸性环境和生产 nisin 的能力(未发表)。利用 sRNA 在乳酸乳球菌 F44 中介导的耐酸调控对构建乳酸乳球菌的耐酸网络具有重要的意义。

3.3 利用反义sRNA“knock down”来调控代谢通路

反式作用调控小 RNA(sRNA)由与 mRNA 互补结合的靶向性反义 RNA 和一个召集宿主 Hfq 的支架组成，随后可以通过核糖核酸酶 E 诱导 mRNA 降解[62]。人工合成反义 sRNA 现已广泛用于基因沉默，sRNA 介导的基因沉默是利用天然 RNA 辅助骨架构建了人工 sRNA，afsRNA 与 mRNA 复合物在 Hfq 协助下实现对内源基因表达进行微调和动态控制[63,64]。

以天然 sRNA 为依据，合理设计人工 sRNA 并将其连入载体质粒上，可以在不改变染色质基因的前提下，实现快速高通量的“knock-down”研究，这在代谢工程中得到了广泛应用[65]（表 4）。如 Lee 等[66]通过在 18 株大肠杆菌菌株中合成调控 sRNA 将酪氨酸生物合成途径中的碳存储调节器(csrA)和酪氨酸抑制因子(tyrR)两个调控因子“knock-down”。然后在 E.coil 中过表达酪氨酸生物合成路径中基因和酪氨酸酚裂合酶(TPL)基因，从葡萄糖出发生产苯酚，最后在 18 株工程菌株中筛选得到了苯酚产量为 3.79 g/L 的 PheBL21 菌株，达到了微生物发酵的最高效价。在大肠杆菌中利用 sRNA 策略来提高目标产品的产量已得到广泛使用，近来，在其他菌株中 sRNA 策略也成功实现了运用，如枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）中，Liu 等[67]应用 sRNA 策略提高 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)的产量。GlcNAc 合成、GlcNA 糖酵解和肽聚糖合成模块竞争相同的前体。为了直接进行 GlcNAc 合成、设计了两个靶向于 *pfk*(编码 6-磷酸果糖激酶)和 *glmM*(编码磷酸葡糖胺变位酶)的 sRNA 分别用于限制糖酵解和肽聚糖合成。为了达到更佳抑制效果，对 Hfq 蛋白进行了共表达。和 sRNA 一起同时抑制 *pfk* 和 *glmM* 表达，优化菌株的 GlcNAc 产量增加了 4.3 倍。在丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum* PJC4BK)中，Changhee Cho 等[68]使用合成 sRNA 敲除 pta 基因使丁醇的产量增加。sRNA 在代谢工程中的应用实例见表 4。

表 4 细菌 sRNA 在代谢工程中的应用实例

Application examples of sRNAs in metabolic engineering

SRNA 类型	调控类型	宿主菌株	靶标基因	产物变化	研究策略
非人工合成	调控环境胁迫	*E. coli* MG1655	*mutS*， *mutD* 和 *ndk*	自发突变频率增加 2000 倍	过表达反义 sRNA[69]
		E. coli MG1655	*rpoS*	酸耐受提高	过表达DsrA，ArcZ 和 RprA[60]
		C.acetobutylicum ATTC 842	/	丁醇耐受性和丁醇产量提高	过表达压力应激 sRNA：6S 和 tmRNA[70]
	调控铁离子	*E.coli* MG1655	*sdhCDAB* 和 acnAB	琥珀酸产量增加 7 倍	过表达 sRNA 基因 RyhB[71]
		E. coli DALA	*hemB*，*hemH*，*acnAB*，*sdhAB*，*fumA*，和 *cydAB*	增加5-氨基乙酰丙酸产量	过表达 sRNA 基因 RyhB[72]
	调控糖代谢	*E. coli* K-12	*ptsG*	醋酸盐分泌减少	过表达 sgrS 基因[73]
人工合成	调控氮代谢	*E.coli* W3110	*pfkA*	1，3-二氨基丙烷的产量提高	合成 128 个 sRNA “knock-down”靶标基因[74]

调控碳代谢	*E. coli* K-12，*E. coli* BL2和*E. coli* W等	*csrA* 和 *tyrR*	苯酚产量提高	合成 sRNA “knock-down”酪氨酸合成途径中调控因子[66]
	E. coli BW25113	*pykF*	琥珀酸产量提高	反义 sRNA 微调代谢通路[75]
	E. coli BKT5	*csr A*	L-酪氨酸产量提高1.2倍	人工设计负调控L-酪氨酸生物合成途径的sRNA[76]
	B. subtilis 168	*pfk*，*glmM*	N-乙酰葡糖胺产量增加了 4.3 倍	设计两个反义sRNA与Hfq蛋白共表达[67]
	C.acetobutylicum PJC4BK	*pta*	丁醇产量提高	合成sRNA系统“knock-down”靶标基因[68]
调控糖代谢	*E. coli WG/pZG07/ pZG08*	*lsrC*、 *ptsH和ptsI 等多个预测靶标*	聚酮6-脱氧红霉素内酯B的产量提高	合成反义sRNA抑制代谢通路基因表达[77]
调控环境胁迫	*E. coli* DH5α	*murE*	酪氨酸和尸胺的产量提高	酪氨酸和尸胺的产量提高[78]

4 小结与展望

RNA 深度测序(RNAseq) 技术的发展和生物信息学预测以及实验分析手段的完善为细菌 sRNA 的发现提供了支持。预测并挖掘出更多天然 sRNA 可以更好地推动代谢工程和合成生物学的发展。但目前仍有很多 sRNA 功能还未通过实验确定，识别细菌 sRNA 的靶标，研究 sRNA 与其靶标之间的相互作用，可以极大地丰富调节代谢工程的方法。

通常加强调控和优化基因电路和代谢途径主要是集中在转录和翻译水平，转录后的方法显示许多优点，如反应迅速、灵活、调控精确，没有代谢负担。通过合理设计 sRNA 来动态调节代谢途径省去了敲除染色体基因和构建突变菌株库的繁琐步骤，可以使菌株的快速发展为理想型菌株；另外，在这一领域的研究将有助于对自然生物网络的控制机制的理解。但是，细菌体内的调控机制十分复杂，一个 sRNA 通常调控多个靶标基因，天然或人工合成 sRNA 在工程菌株中所调控的不同路径是否存在相互影响，人工 sRNA 与天然 sRNA 之间是否有相互作用，而且 sRNA 上游调控机制尚未清楚；这些问题的解决可以帮助我们更好的利用 sRNA 来调节工程菌株的代谢途径。目前，细菌 sRNA 的研究与应用大多数集中在大肠杆菌等模式生物中，对致病菌的 sRNA 研究还有待进一步深入。随着对 sRNA 与靶标 mRNA 或靶标蛋白作用机制的进一步深入研究，相信会有更多的 sRNA 功能被发现，也为工程菌株的改造、致病微生物的预防和工业微生物育种等提供了保障。

参考文献

[1] Mitarai N. Efficient degradation and expression prioritization with small regulatory RNAs. Physical Biology, 2007, 4(3): 164-171.

[2] Abu-Qatouseh L F, Chinni S V, Seggewiß J, et al. Identification of differentially expressed small non-protein-coding RNAs in Staphylococcus aureus displaying both the normal and the small-colony variant phenotype[J]. Journal of Molecular Medicine, 2010, 88(6): 565-575.

[3] Raabe C A, Hoe C H, Randau G, et al. The rocks and shallows of deep RNA sequencing: Examples in the Vibrio cholera RNome. RNA, 2011, 17(7): 1357-1366.

[4] Perez N, Trevi o J, Liu Z, et al. A genome-wide analysis of small regulatory RNAs in the human pathogen group A Streptococcus. PloS One,2009,4(11) : e7668.

[5] van der Meulen S B, de Jong A, Kok J. Transcriptome landscape of Lactococcus lactis reveals many novel RNAs including a small regulatory RNA involved in carbon uptake and metabolism. RNA biology, 2016, 13(3): 353-366.

[6] Eggenhofer F, Tafer H, Stadler PF, Hofacker IL. RNApredator: fast accessibility-based prediction of sRNA targets. Nucleic acids research, 2011, 39:W149 – 54.

[7] Wang J, Liu T, Zhao B, et al. sRNATarBase 3.0: an updated database for sRNA-target interactions in bacteria. Nucleic acids research, 2015, 44:D248-D253.

[8] Wright P R, Richter A S, Papenfort K, et al. Comparative genomics boosts target prediction for bacterial small RNAs. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(37): E3487-E3496.

[9] Wright P R, Georg J, Mann M, et al. CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and interaction domains. Nucleic acids research, 2014, 42(W1): W119-W123.

[10] Mückstein U, Tafer H, Hackermüller J, et al. Thermodynamics of RNA–RNA binding. Bioinformatics 2006;22:1177–82.

[11] Ying X, Cao Y, Wu J, et al. STarPicker: a method for efficient prediction of bacterial sRNA targets based on a two-step model for hybridization. PLoS One, 2011, 6(7): e22705.

[12] Busch A, Richter A S, Backofen R. IntaRNA: efficient prediction of bacterial sRNA targets incorporating target site accessibility and seed regions. Bioinformatics, 2008, 24(24): 2849-2856.

[13] Lorenz R, Bernhart S H, Zu Siederdissen C H, et al. ViennaRNA Package 2.0. Algorithms for Molecular Biology, 2011, 6(1): 26.

[14]Tafer H,Hofacker IL. RNAplex:a fast tool for RNA-RNA interaction search. Bioinformatics, 2008, 24(22): 2657-2663.

[15] Kery M B, Feldman M, Livny J, et al. TargetRNA2: identifying targets of small regulatory RNAs in bacteria. Nucleic acids research, 2014, 42(W1): W124-W129.

[16] Krüger J, Rehmsmeier M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. Nucleic acids research, 2006, 34(suppl 2): W451-W454.

[17] Papenfort K, Vanderpool C K. Target activation by regulatory RNAs in bacteria. FEMS microbiology reviews, 2015, 39(3): 362-378.

[18] Ingolia N T, Ghaemmaghami S, Newman J R S, et al. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. Science, 2009, 324(5924): 218-223.

[19] Wang J, Rennie W, Liu C, et al. Identification of bacterial sRNA regulatory targets using ribosome profiling. Nucleic acids research, 2015, 43 (21): 10308-10320.

[20] Delihas N , Forst S . MicF: an anti sense RNA gene involved in response of Escherichia coil to global stress factors . Journal of molecular biology, 200l , 3 13(1) : 1-12.

[21] Douchin V, Bohn C, Bouloc P. Down-regulation of porins by a small RNA bypasses the essentiality of the

regulated intramembrane proteolysis protease RseP in Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry,2006 ,281(18):12253-12259.

[22] Antal M , Borteau V, Douchin V , et al . A small bacterial RNA regulates a Putative ABC transporter . Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(9): 7901-7908.

[23] 董浩, 彭小薇, 王晓英, 等. 染色质免疫共沉淀技术对羊种布鲁氏菌转录调控因子 MucR 靶基因的筛选. 中国农业大学学报, 2016, 21(4): 102-106.

Dong H,Peng X W,Wang X Y,et al.Identification of the targets of MucR by chromatin immunop recip itation in Brucella melitensis[J]. Journal of China Agricultural University, 2016,(04):102-106.

[24] Pulvermacher S C, Stauffer L T, Stauffer G V. Role of the sRNA GcvB in regulation of cycA in Escherichia coli. Microbiology, 2009, 155(1): 106-114.

[25] Rasmussen A A, Eriksen M, Gilany K, et al. Regulation of ompA mRNA stability the role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control. Molecular microbiology, 2005,58(5):1421-1429.

[26] Cho K H, Kim J H. Cis-encoded non-coding antisense RNAs in streptococci and other low GC Gram (+) bacterial pathogens. Frontiers in genetics, 2015, 6.

[27] Davanloo P, Rosenberg A H, Dunn J J, et al. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984, 81(7): 2035-2039.

[28] McCullen C A, Benhammou J N, Majdalani N, et al. Mechanism of positive regulation by DsrA and RprA small noncoding RNAs: pairing increases translation and protects rpoS mRNA from degradation. Journal of bacteriology, 2010, 192(21): 5559-5571.

[29] Salvail H, Lanthier-Bourbonnais P, Sobota J M, et al. A small RNA promotes siderophore production through transcriptional and metabolic remodeling. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(34): 15223-15228.

[30] Opdyke J A, Fozo E M, Hemm M R, et al. RNase III participates in GadY-dependent cleavage of the gadX-gadW mRNA. Journal of molecular biology, 2011, 406(1): 29-43.

[31] Opdyke J A, Fozo E M, Hemm M R, et al. RNase III participates in GadY-dependent cleavage of the gadX-gadW mRNA. Journal of molecular biology, 2011, 406(1): 29-43.

[32] Tramonti A, De Canio M, De Biase D. GadX/GadW‐dependent regulation of the Escherichia coli acid fitness island: transcriptional control at the gadY–gadW divergent promoters and identification of four novel 42 bp GadX/GadW‐specific binding sites. Molecular microbiology, 2008, 70(4): 965-982.

[33] Mackie GA.RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay.Nature Reviews Microbiology,2012,11(1):45-57.

[34] Saramago M, Bárria C,dos Santos RF, et al.The role of RNases in the regulation of small RNAs.Current Opinion in Microbiology,2014,18(4): 105-115.

[35] Wang J, Rennie W, Liu C, et al. Identification of bacterial sRNA regulatory targets using ribosome profiling. Nucleic acids research, 2015: gkv1158.

[36] Smirnov A, Förstner K U, Holmqvist E, et al. Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(41): 11591-11596.

[37] Zhang A, Schu D J, Tjaden B C, et al. Mutations in interaction surfaces differentially impact E. coli Hfq association with small RNAs and their mRNA targets. Journal of molecular biology, 2013, 425(19): 3678-3697.

[38] Majdalani N, Cunning C, Sledjeski D, et al. DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(21): 12462-12467.

[39] Majdalani N, Hernandez D, Gottesman S. Regulation and mode of action of the second small RNA activator

of RpoS translation, RprA. Molecular microbiology, 2002, 46(3): 813-826.

[40] Mandin P, Gottesman S. Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA. The EMBO journal, 2010, 29(18): 3094-3107.

[41] Lee C A, Fournier M J, Beckwith J. Escherichia coli 6S RNA is not essential for growth or protein secretion. J Bacteriol, 1985, 161(3): 1156-1161.

[42] Willkomm D K, Hartmann R K. 6S RNA: an ancient regulator of bacterial RNA polymerase rediscovered. Biol Chem, 2005, 386(12): 1273-1277.

[43] Smaldone GT, Revelles O, Gaballa A, et al. A global investigation of the Bacillus subtilis iron-sparing response identifies major changes in metabolism. Journal of bacteriology, 2012, 194(10): 2594-2605.

[44] Richter AS, Schleberger C, Backofen R. Seed-based INTARNA prediction combined with GFP-reporter system identifies mRNA targets of the small RNA Yfr1. Bioinformatics, 2010, 26(1): 1-5.

[45] Romeo A, Sonnleitner E, Sorger-Domenigg T, et al. Transcriptional regulation of nitrate assimilation in Pseudomonas aeruginosa occurs via transcriptional antitermination within the nirBD–PA1779–cobA operon. Microbiology, 2012, 158(Pt 6): 1543-1552.

[46] Romeo T. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. Molecular microbiology, 1998, 29(6): 1321-1330.

[47] Wilderman P J, Sowa N A, David J. Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in Pseudomonas aeruginosa involved in iron homeostasis. PNAS, 2004, 101(26): 9792-9797.

[48] Khan M A, Göpel Y, Milewski S, et al. Two Small RNAs Conserved in Enterobacteriaceae Provide Intrinsic Resistance to Antibiotics Targeting the Cell Wall Biosynthesis Enzyme Glucosamine-6-Phosphate Synthase. Frontiers in Microbiology, 2016, 7.

[49] Rutherford S T, van Kessel J C, Shao Y,et al. AphA and LuxR/HapR reciprocally control quorum sensing in vibrios.Genes & Development, 2011,25(4): 397-408.

[50] Rutherford S T, van Kessel J C, Shao Y,et al. AphA and LuxR/HapR reciprocally control quorum sensing in vibrios.Genes & Development, 2011,25(4): 397-408.

[51] Romeo A, Sonnleitner E, Sorger-Domenigg T, et al. Transcriptional regulation of nitrate assimilation in Pseudomonas aeruginosa occurs via transcriptional antitermination within the nirBD–PA1779–cobA operon. Microbiology, 2012, 158(Pt 6): 1543-1552.

[52] Jonas K, Melefors O. The Escherichia coli CsrB and CsrC small RNAs are strongly induced during growth in nutrient-poor medium. FEMS microbiology letters, 2009, 297(1): 80-86.

[53] Oglesby A G, Murphy E R, Iyer V R, et al. Fur regulates acid resistance in Shigella flexneri via RyhB and ydeP. Molecular microbiology, 2005, 58(5): 1354-1367.

[54] Dudin O, Lacour S, Geiselmann J. Expression dynamics of Rpo S/Crl-dependent genes in Escherichia coli . Research in Microbiology, 2013, 164(8): 838-847.

[55] Updegrove T B, Wartell R M. The influence of Escherichia coli Hfq mutations on RNA binding and sRNA• mRNA duplex formation in rpoS ribo regulation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2011, 1809(10): 532-540.

[56] Majdalani N, Hernandez D, Gottesman S. Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. Molecular microbiology, 2002, 46(3): 813-826.

[57] Papenfort K, Said N, Welsink T, et al. Specific and pleiotropic patterns of mRNA regulation by ArcZ, a conserved, Hfq‐dependent small RNA. Molecular microbiology, 2009, 74(1): 139-158.

[58] Sledjeski D D, Gupta A, Gottesman S. The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in Escherichia coli. The EMBO Journal, 1996, 15(15): 3993.

[59] Zhang A, Altuvia S, Tiwari A, et al. The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq

(HF－I) protein. The EMBO journal, 1998, 17(20): 6061-6068.

[60] Gaida S M, Al-Hinai M A, Indurthi D C, et al. Synthetic tolerance: three noncoding small RNAs, DsrA, ArcZ and RprA, acting supra-additively against acid stress. Nucleic acids research, 2013, 41(18): 8726-8737.

[61] Kang Z, Wang Q, Zhang H, et al. Construction of a stress-induced system in Escherichia coli for efficient polyhydroxyalkanoates production. Applied microbiology and biotechnology, 2008, 79(2): 203-208.

[62] Aiba H: Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. Curr Opin Microbiol, 2007, 10:134-139.

[63] Park H, Bak G, Kim SC, et al. Exploring sRNA-mediated gene silencing mechanisms using artificial small RNAs derived from a natural RNA scaffold in Escherichia coli. Nucleic acids research, 2013, 41(6): 3787-3804.

[64] Sharma V, Yamamura A, Yokobayashi Y. Engineering Artificial Small RNAs for Conditional Gene Silencingin Escherichia coli. ACS synthetic biology, 2011, 1(1): 6-13.

[65] Yoo S M, Na D, Lee S Y,et al. Design and use of synthetic regulatory small RNAs to control gene expression in Escherichia coli . Nature protocols, 2013, 8(9): 1694-1707.

[66]Na D, Lee S Y, Kim B, et al.Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of phenol from glucose . Nature biotechnology, 2014, 9, 621－629.

[67] Liu Y, Zhu Y, Li J, Shin H, Chen RR, Du G, Liu L, Chen J: Modular pathway engineering of Bacillus subtilis for improved N-acetylglucosamine production. Metabolic engineering, 2014, 23: 42-52.

[68] Cho C, Lee S Y. Efficient gene knockdown in Clostridium acetobutylicum by synthetic small regulatory RNAs. Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114(2): 374-383.

[69] Nakashima N, Tamura T. Conditional gene silencing of multiple genes with antisense RNAs and generation of a mutator strain of Escherichia coli. Nucleic acids research, 2009, 37(15): e103-e103.

[70] Jones A J, Venkataramanan K P, Papoutsakis T. Overexpression of two stress-responsive, small, non-coding RNAs, 6S and tmRNA, imparts butanol tolerance in Clostridium acetobutylicum. FEMS microbiology letters, 2016, 363(8): fnw063.

[71] Kang Z, Wang X, Li Y, et al. Small RNA RyhB as a potential tool used for metabolic engineering in Escherichia coli. Biotechnology letters, 2012, 34(3): 527-531.

[72] Li F, Wang Y, Gong K, et al. Constitutive expression of RyhB regulates the heme biosynthesis pathway and increases the 5-aminolevulinic acid accumulation in Escherichia coli. FEMS microbiology letters, 2014, 350(2): 209-215.

[73] Negrete A, Majdalani N, Phue J N, et al. Reducing acetate excretion from E. coli K-12 by over-expressing the small RNA SgrS. New biotechnology, 2013, 30(2): 269-273.

[74] Chae T U, Kim W J, Choi S, et al. Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of 1,3-diaminopropane, a three carbon diamine. Scientific reports, 2015, 5:13040-13053.

[75] Zhao Y, Wang C S, Li F F, et al. Targeted optimization of central carbon metabolism for engineering succinate production in Escherichia coli. BMC biotechnology, 2016, 16(1): 52.

[76] 姚元锋， 赵莹， 赵广荣. 人工 sRNA 沉默 csrA 基因以优化大肠杆菌生产 L-酪氨酸. 中国生物工程杂志，2013，33(8) 60-65.

Yao Y F,Zhao Y,Zhao G R. Artificial sRNAs silencing csrA to optimize the production of L-tyrosine in Escherichia coli[J].China Biotechnology, 2013, 33(8): 60-65.

[77] Meng H L, Xiong Z Q, Song S J, et al. Construction of polyketide overproducing Escherichia coli strains via synthetic antisense RNAs based on in silico fluxome analysis and comparative transcriptome analysis. Biotechnology journal, 2016, 11, 530–541.

[78] Yoo S M, Na D, Lee S Y. Design and use of synthetic regulatory small RNAs to control gene expression in Escherichia coli. Nat Protoc 2013, 8:1694-1707.